

学校编码: 10384

分类 \_\_\_\_\_ 号: \_\_\_\_\_ 密

级:

学 号: 9626016

UDC: \_\_\_\_\_

## 学 位 论 文

### 丝状蓝藻 *Calothrix* sp. PCC7601 基因整合平台系统 的构建和应用研究

罗 田

指导教师: \_\_\_\_\_ 楼 士 林 教授

\_\_\_\_\_ 厦门大学 生物学系

申请学位级别: \_\_\_\_\_ 硕 士 \_\_\_\_\_ 专 业 名 称: \_\_\_\_\_ 生 物 化 学

论文提交日期: \_\_\_\_\_ 1999 年 8 月 \_\_\_\_\_ 论文答辩日期: \_\_\_\_\_ 1999 年 8 月

学位授予单位和日期: \_\_\_\_\_ 厦 门 大 学 \_\_\_\_\_ 1999 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评阅人: \_\_\_\_\_

1999 年 8 月 日

# 目 录

摘 要 .....	I
Abstract .....	II
前言 .....	1
材料和方法	
一、 材料 .....	10
二、 实验方法 .....	13
结果与分析	
一、 cpc2 启动区 (P) 和同源片段 (L、R) 的克隆 .....	20
1. 片段 P、L 和 R 的 PCR 扩增 .....	20
2. 片段 P、L 和 R 的克隆 .....	22
二、 外源供体 DNA 片段的克隆 .....	25
1. 报告基因 (Km <sup>r</sup> ) 和终止区 (rbcS polyA) 的克隆 .....	25
2. 目的基因 (Ub-T $\alpha_1$ ) 的获得 .....	27
3. 目的基因 (Ub-T $\alpha_1$ ) 的克隆 .....	28
三、 供体质粒电激转化 <i>Calothrix</i> 7601 .....	30
四、 转化藻株的 PCR 鉴定 .....	32
五、 转化藻株的 Western 杂交鉴定 .....	32
讨论 .....	34
参考文献 .....	36
致谢 .....	41

## 摘 要

蓝藻 (Cyanophyte) 又称蓝细菌 (Cyanobacterium), 在光合作用、固氮、遗传以及进化等方面表现出独特的性质, 长期以来受到生物工作者的重视和深入的研究。特别是近年来, 随着基因工程研究的迅速发展, 很多学者认为蓝藻可能成为表达外源基因的很好的自养型受体系统, 并已建立了一些蓝藻的基因转移系统和外源基因表达系统。然而有关丝状蓝藻转基因的研究进展缓慢, 主要原因为不易构建能在丝状蓝藻细胞中稳定维持的质粒载体系统, 为使引入的外源基因能在丝状蓝藻中稳定维持和表达。本研究构建了丝状蓝藻 *Calothrix* sp. PCC7601 的基因整合平台系统, 并表达了含有胸腺素  $\alpha_1$  (Thymosin  $\alpha_1$ , T $\alpha_1$ ) 的融合蛋白。

根据前人对 *Calothrix* sp. PCC7601 基因组部分序列分析结果, 用 PCR 扩增出藻蓝蛋白

操纵子 2 (cpc2) 中的两个相邻片段作为基因整合的同源序列。然后经多步亚克隆, 在这两个同源片段之间插入了包括目的基因 Ub-T $\alpha$ 1 融合基因和报告基因卡那霉素抗性基因 (Km<sup>r</sup>) 的外源供体 DNA 片段, 构建成基因整合平台系统的供体质粒 pUTK。为使建立的基因整合平台系统能高效表达, 本研究用 PCR 扩增出 cpc2 的完整启动区作为目的基因表达的启动子, 它是红光诱导的强启动子。为了提高胸腺素  $\alpha$ 1 的表达量, 还采用了泛素 (Ubiquitin, UB) 融合表达的办法。

供体质粒 pUTK 电激转化 *Calothrix* sp. PCC7601 后, 以 Km 筛选, 获得了若干转化藻株, 其对 Km 的抗性皆超过 40ug/ml, 最高可达 80ug/ml, 并在转接若干次之后仍基本保持不变。经 PCR 证实, 目的基因 Ub-T $\alpha$ 1 已整合在 *Calothrix* sp. PCC7601 染色体上, 可随染色体的复制而复制; 经 Western 杂交证实, 融合蛋白确有表达。

本研究实现了外源目的基因通过基因整合平台系统在转化藻株中的有效表达, 为开发转 T $\alpha$ 1 基因蓝藻打下了基础

关键词: *Calothrix* sp. PCC7601, 基因整合, 胸腺素  $\alpha$ 1

## Construction and Application Research of Gene Integration Platform System for the Filamentous Cyanobacterium *Calothrix* sp. PCC7601

### Abstract

Cyanobacteria show special character in photosynthesis, nitrogen fixation, genetics and evolution, and are focused on by biological researchers all the time. The great progress in gene engineering of Cyanobacteria makes many biologists believe that cyanobacteria may become a new acceptor system for expression of heterologous gene. Several exogenous gene transfer and expression systems were constructed, but the progress of filamentous cyanobacteria is less, partly because the vectors that can be stable in the filamentous cyanobacteria are difficult to be constructed. In this article, we constructed a gene integration platform system for the filamentous cyanobacteria *Calothrix* sp. PCC7601 which may be a new way for the expression of heterologous genes in the filamentous cyanobacteria, and by this system thymosin  $\alpha$ 1 (T $\alpha$ 1) gene is expressed.

According to the known sequence of phycocyanin-2 (cpc2) in the *Calothrix* sp. PCC7601 chromosomal DNA, we cloned two 1.2Kb fragments of it by PCR, and use them as the integration homologous fragments. After several steps of subcloning donor DNA between two homologous fragments, the donor plasmid pUTK that can integrate into the chromosomal DNA of *Calothrix* sp. PCC7601 was constructed. Donor DNA include cpc2 promoter, target gene (Ub-T $\alpha$ 1), rbcS polyA terminator and reporter gene (kanamycin resistance gene, Km<sup>r</sup>). In order to express T $\alpha$ 1 Gene in a high level through the integration platform system, firstly we cloned the cpc2 promoter(0.6Kb) by PCR, which is a strong

promoter induced by red light, secondly we fused the ubiquitin gene (Ub) to T $\alpha$  1 gene.

Donor plasmid was transformed into *Calothrix* sp. PCC7601 by electroporation. Screen by kanamycin, we gained several transformants, which can resist more than 40ug/ml kanamycin and remain the resistance after more than ten generations. The result of PCR implied that Ub-T $\alpha$  1 gene locate on the chromosomal DNA of *Calothrix* sp. PCC7601 and can replicate with it. By western blot analysis, it was confirmed that the fusion protein was expressed.

This research work realized the expression of foreign gene in *Calothrix* sp. PCC7601 by gene integration platform system ,and give a basis for developing transfer T $\alpha$  1 gene cyanobacterium.

**Keywords:** *Calothrix* sp. PCC7601, gene integration, thymosin  $\alpha$  1

## 前 言

### 一、 蓝藻是基因工程的一种很好的受体系统

蓝藻 (Cyanophyte) 是一种特殊的微生物。因其具有原核生物的细胞特征, 缺细胞核、叶绿体、线粒体等细胞器, 染色体 DNA 裸露, 细胞壁结构为 G<sup>-</sup>, 因此又被称为蓝细菌 (Cyanobacterium)。

蓝藻在地球上出现已有三十多亿年, 经过长期的演化, 蓝藻能适应各种生态环境, 分布广泛, 在高温泉水中, 极地冰层下, 干旱沙漠地带以及高盐湖泊里均有蓝藻生存。蓝藻能进行放氧型光合作用, 是地球上早期大气氧的主要提供者; 许多蓝藻具有自生固氮能力, 是开拓不毛之地的先行者; 有些蓝藻具有放氢功能, 可供开发清洁的能源; 有些蓝藻富含蛋白质, 是天然的单细胞蛋白资源; 有些蓝藻还能净化污水, 可用来清理环境污染。正因为蓝藻在光合作用、固氮、细胞化学、遗传和进化等方面所表现出的独特性质, 其研究进展迅速。

蓝藻的基因组简单, 除了裸露的染色体 DNA 外不含叶绿体和线粒体 DNA, 便于进行基因分析。至今检测过的蓝藻中, 几乎有一半含有内源质粒。这些特性为开展蓝藻基因工程研究提供了有利条件。近年来, 已克隆了大量蓝藻基因, 建立了一些蓝藻的基因转移系统以及外源基因表达系统。这些工作为蓝藻基因工程研究奠定了基础<sup>[1, 2]</sup>。

与大肠杆菌、枯草杆菌、酵母及动植物细胞相比, 蓝藻作为外源基因表达受体菌有其独到之处。蓝藻是原核生物, 基因组简单; 蓝藻培养条件简单, 成本低廉, 只需光、CO<sub>2</sub>、无机盐及适当的温度即可, 并且适于用连续和静止等多种方法培养; 其细胞体积大, 对外源蛋白的容受力较高, 并且只有在特殊情况 (如氮饥饿) 下才部分或大量地降解胞内蛋白质<sup>[3, 4]</sup>; 同时蓝藻含有丰富的人体和动物的必需氨基酸和生物活性物质或前体, 消化率高, 是食品和饲料的重要来源, 许多国家极为重视大力发展蓝藻养殖业。总之, 以蓝藻作为基因工程受体菌有着重大的科学意义和良好的应用前景。

蓝藻作为表达外源基因的受体菌已取得了不少研究成果。Tandeau de Marsac (1987) 以 pUC303 为载体在单胞藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 (简称 *Synechococcus* 7942, 其余藻名

依此类推)中表达了原核生物芽孢杆菌杀幼蚊毒素基因<sup>[5]</sup>; Fukuda 等(1994)在 *Synechococcus* 7942 中表达了植物的乙烯合成酶基因<sup>[6]</sup>; Takeshima (1994)在 *Synechococcus* 7942 中表达了合成的人过氧化物歧化酶基因(h-sod),产物占总蛋白量的3%,并且有良好的胞内生物活性<sup>[7]</sup>;孙军等(1994)在 *Anabaena* 7120 中表达了小鼠的金属硫蛋白基因(mt-1)<sup>[8]</sup>。这些研究工作表明包括真核基因在内的外源基因能在蓝藻中表达。

因此,本研究采用蓝藻作为表达外源基因的受体菌。

## 二、基因整合平台系统是蓝藻转基因的理想途径

1970年 Shestakor 和 Khyen 首先在 *Anacystis nidulians* 中发现DNA对蓝藻的转化作用。目前已有多种方法向蓝藻中导入外源基因。一种是遗传转化(Genetic transformation),包括天然转化,诱导转化和电激穿孔(Electroporation)转化。一些单细胞蓝藻如 *Synechococcus* sp.PCC7942 能够在指数生长期有效地吸纳外源DNA,即为天然转化;另一些蓝藻如 *Synechocystis* 6803 则需用  $\text{Ca}^{2+}$  人工诱导感受态<sup>[9]</sup>; Takeyama 等(1989)用 *Synechococcus* NKBG042902 的 pSY111 质粒与 *E.coli* 的 pUC18 质粒构建了穿梭质粒 pUSY02,电激转化 NKBG042902-YG1116 藻株,在  $\text{Ca}^{2+}$  和15%甘油处理下获得高频率转化子<sup>[10]</sup>。另一种是结合转移(Conjugal transfer)。Wolk 等人建立了丝状蓝藻 *Anabaena* 的结合转移系统,这个系统要求存在结合质粒、辅助质粒及 pRL 系列穿梭质粒,亦已扩大应用于其他丝状蓝藻及某些单胞藻,成为目前较为有效的转化方法。此外, Thiel (1989)用穿梭质粒 pRL6 直接电激转化 *Anabaena*,在高场强、短间隙处理下获得高转化率<sup>[11]</sup>; Chiang (1992)用接合转移和电激转移的方法转化 *Calothrix* 7601 也获得成功<sup>[12]</sup>。

迄今已构建的蓝藻质粒载体都是含有细菌遗传标记的重组质粒,能在细菌和蓝藻中复制并表现出选择标记,被称为穿梭质粒(Shuttle plasmid),如 Cobley (1993)构建的 *Calothrix* 7601 与 *E.coli* 的穿梭质粒 pJCF69101<sup>[13]</sup>。但穿梭质粒有一个主要的缺点是在蓝藻中不稳定,容易丢失,而基于同源重组原理上的基因整合平台系统的出现可望解决这一问题。

同源重组现象早已发现并进行了深入研究,其机制比较清楚,被广泛地作为外源基因插入染色体DNA的方法<sup>[14, 15]</sup>。基因整合平台系统(Gene integration platform system)由受体染色体上的基因整合平台和供体质粒组成。后者含有与整合平台同源的DNA片断和外源基因,通过同源片断间的重组双交换,外源基因被整合到染色体的固定靶位上(见图1)。整合的外源基因可随染色体的复制而复制,从而克服了穿梭质粒稳定性差的问题。

基因整合平台系统在蓝藻中已有应用。Williams (1988)以此法用高等植物的 psb 基因取代了 *Synechocystis* 6801 的 psb 基因<sup>[16]</sup>; Labarre (1989)以随机的 *Synechococcus* 6803 染色体片断与外源氯霉素乙酰基转移酶基因(cat)重组,转化 *Synechococcus* 6803 细胞,发现在某些克隆子中,cat 基因稳定地整合在染色体上并能有效表达<sup>[17]</sup>; Van de plas (1990)以定位在 *Synechococcus* 7942 染色体上的亚甲四氢叶酸还原酶基因(metF)为靶位构建基因整合平台,把质体蓝素基因(petE1)和铁氧还蛋白基因(petF1)整合到 metF 上<sup>[18]</sup>; Merida (1992)用 *Anabaena* 7002 的 gln 基因取代了 *Synechococcus* 6803 的 gln 基因<sup>[19]</sup>; Capuano (1993)把 *Calothrix* 7601 的 apc 基因插入到 *Synechococcus* 7942 染色体上<sup>[20]</sup>; Zhang J 等(1998)将卡那霉素抗性基因( $\text{Km}^r$ )插入到 *Synechococcus* 7942 的铁缺乏诱导基因 isiAB 靶位上<sup>[21]</sup>。

本研究以 *Calothrix* 7601 的 cpc2 基因为整合平台构建相应的供质粒,此系统对尚缺

乏有效质粒载体的 *Calothrix* 7601 而言具有重大意义。

藻胆体 (Phycobilisome, PBS) 是蓝藻的光合系统 II (PSII) 的光能捕获器, 其蛋白含量可高达细胞可溶性蛋白总量的 50%~60%。它由两类蛋白组成, 一类是含色素 (Pigment) 的藻胆蛋白 (Phycobiliprotein, PBP), 占 PBS 总蛋白的 85% 左右; 另一类则是无色的连接多肽 (Linker polypeptide, LP), 含量只占 PBS 总蛋白的 15% 左右。前者是吸收光子的承

图 1 基因整合平台系统示意图<sup>[15]</sup>

Fig.1 Gene integration platform system

*Synechococcus* 7942 R2-PIM9 是一个外源片断整合到 *Synechococcus* 7942 染色体的 *metF* 基因中得到的衍生藻株。该外源片断含有一个启动子失活的 *bla* 基因 (表达氨苄青霉素抗性), 一个完整的 *neo* 基因以及 pBR322 的 *oriV* <sup>[18]</sup>。R2-PIM9 染色体上的这个外源片断作为基因整合平台。作为供体质粒的 pPM98 是克隆有 *Calothrix* 7601 的 *apcE* 基因的 pBR322 衍生质粒, 含有完整的 *bla* 基因和 *oriV*。pPM98 进入 R2-PIM9 细胞并与其染色体 DNA 发生同源双交换, *Calothrix* 7601 *apcE* 基因取代 *neo* 而得到新的衍生藻株 *Synechococcus* 7942 PIM9-S1。

担者, 后者除维持超分子复合体结构外, 还保证光能的传递<sup>[22]</sup>。近一二十年来, 对蓝藻许多株系 PBS 的结构和组分, 及其基因的克隆和序列测定等方面开展了深入的研究, 成果丰硕, 为开展蓝藻基因工程奠定了良好的基础。这些藻株有 *Calothrix* 7601, *Synechococcus* 6301, *Anabaena* 7120, *Mastigocladus laminosus*, *Synechococcus* 7002, *Synechocystis* 6701 等。

本研究的材料 *Calothrix* 7601 又名 *Fremyella diplosiphon*, 是比较典型的也是相对研究得较多的藻株之一。依照 Tandeau de Marsac (1983) 的分类法<sup>[23]</sup>它属于第三类, 即全色适应 (Complete chromatic adaptation) 型蓝藻, 其藻胆蛋白的成分可随光波波长的变化而变化。在红光下藻蓝蛋白-1 (Phycocyanin-1, PC1) 和藻蓝蛋白-2 (PC2) 大量表达, 而在绿光下 PC1 和藻红蛋白 (Phycoerythrin, PE) 大量表达, 因此藻体在红光下培养显蓝色, 在绿光下培养显红色, 此现象被称为互补色适应 (Complementary chromatic adaptation)。PBS 对光的这种适应性使其捕获光的能力与传递能量的效率处于最佳水平。PBS 的核心结构 (Core) 含有别藻蓝蛋白 (Allophycocyanin, AP) 和 B-别藻蓝蛋白 (APB), 它不随光波长变化而变化。

迄今, PBS 相关的基因大多数已被克隆 (见表-1)。所有编码主要藻胆蛋白  $\alpha$  和  $\beta$  亚基的基因都是相邻的, 且以同一操纵子共转录。相应的连接多肽的基因多数情况下也是存在于同一操纵子中, 这些基因共转

表-1 *Calothrix* 7601 藻胆体各蛋白组分及其基因

Tab.1 Proteins and their genes of PBS of *Calothrix* 7601

别藻蓝蛋白及 相关连接多肽	基因	<i>apcA1</i>	<i>apcA2</i>	<i>apcD</i>	<i>apcB1</i>	?	<i>apcE</i>
	蛋白	$\alpha^{AP1}$	$\alpha^{AP2}$	$\alpha^{AP3}$	$\beta^{AP1}$	$\beta^?$	连接多肽

藻蓝蛋白及相关连接多肽	基因	cpcA1	cpcA2	cpcA3	cpcB1	cpcB2	cpcB3
	蛋白	$\alpha^{PC1}$	$\alpha^{PC2}$	$\alpha^{PC3}$	$\beta^{PC1}$	$\beta^{PC2}$	$\beta^{PC3}$
	基因	cpcE	cpcF	cpcD、H、I、G、L、M			
	蛋白	色基化酶	转译调控因子	连接多肽			
藻红蛋白及相关连接多肽	基因	cpeA	cpeB	cpeC、D、E		orfY、Z	
	蛋白	$\alpha^{PE}$	$\beta^{PE}$	连接多肽		?	



图 2 *Calothrix* 7601 藻蓝蛋白基因以及相关的连接多肽基因

Fig.2 cpc genes and their corresponding linker peptide genes of *Calothrix* 7601

录出多种断裂产物。多数情况下，这些产物的 5' 端相同而 3' 端不同。短的往往只编码藻胆蛋白  $\alpha$  和  $\beta$  亚基，相对含量也最高。在已知的藻胆蛋白基因中，apc 的亚基基因为  $\alpha$  前  $\beta$  后，cpc 和 cpe 的则相反，这种方式在蓝藻中是保守的。有一些基因的产物可能是同功的，例如  $\alpha^{pc1}$ ， $\alpha^{pc2}$  和  $\alpha^{pc3}$ ，这意味着 PBS 可以通过结构微调以适应入射光波长和强度的变化 [24, 25]。

*Calothrix* 7601 PBS 基因中含有三种 cpc 操纵子（图 2），其中受红光诱导的藻蓝蛋白 cpc2 操纵子在别藻蓝蛋白 apc 操纵子下游约 5kb 处，包括五个基因：cpcB2、A2、H、I 和 D，转录出 1.6kb mRNA 和 3.8kb mRNA。1.6Kb mRNA 是 3.8Kb mRNA 的转录后加工产物，翻译出亚基  $\alpha^{pc2}$  和  $\beta^{pc2}$  [24, 26]。3.8Kb mRNA 还转录出三个与 PC2 相关的连接多肽 [27, 28]。

*Calothrix* 7601 PBS 中不受光调控的 cpc1 操纵子在 cpc2 操纵子下游约 3.5kb 处，同 cpc2 以同一方向转录。cpcB1、A1 和 E 三个基因属同一操纵子，而 cpcF 是单独转录的。cpcB1A1 编码亚基  $\alpha^{pc1}$  和  $\beta^{pc1}$ ，而 cpcE 产物与  $\alpha^{pc}$  色基化有关。对 *Calothrix* 7601 的 cpcF 突变体的研究表明，cpcF 基因产物参与藻胆蛋白合成的某些调节过程，被认为是 cpc3 和 cpe 转录的正调控因子 [29]。

*Calothrix* 7601 的 cpc3 操纵子在缺硫的情况下开始转录 [3]。cpcB3A3 的产物  $\alpha^{pc3}$  和  $\beta$

$\text{pc}^3$  的功能尚未明确, 推测与  $\alpha^{\text{pc}2}$  和  $\beta^{\text{pc}2}$  相似, 是 PC 的同功蛋白。CpcL 和 cpcM 位于 cpcB3A3 下游, 其编码的多肽与 cpc2 编码的连接多肽以及 *Synechococcus* 7002<sup>[30]</sup> 和 *Mastigocladus laminosus*<sup>[27]</sup> 的某些连接多肽有大约 55% 的同源性, 因此被认为是  $\alpha^{\text{pc}3}$  和  $\beta^{\text{pc}3}$  相应的连接多肽。

在蓝藻中 cpc 操纵子一般优先表达, 且具有极强的启动子。它转录的 mRNA 及其翻译的相应蛋白产物多而且很稳定。序列分析的结果表明, cpc 启动子与大肠杆菌的启动子明显不同, 多数基因的 5' 端没有类似大肠杆菌的-35 保守序列, 部分有类似-10 保守序列。但对多种藻株的研究表明, 藻胆蛋白基因编码区上游确实有保守性较高的序列, 被认为与转录启动子相关<sup>[31]</sup>。对 cpc2 操纵子的启动区已经研究清楚, -76~-36 区是启动子。-162~-122 和-37~+25 区是调控序列, 前者可以调节 cpc2 表达强弱, 后者是光诱导蛋白的结合位点<sup>[32]</sup>。

藻胆蛋白基因的表达受到不同水平的调控, 而转录水平的调控是其最重要方式。本研究利用红光诱导的 cpc2 启动子在 *Calothrix* 7601 中表达外源基因, 便于人为调控。

### 三、胸腺素 $\alpha_1$ 及其基因的克隆

胸腺 (Thymus) 是免疫系统中重要的中枢器官, 负责 T 细胞的分化和成熟, 在抗感染、抗肿瘤和抗自身免疫性疾病中起着重要作用。1966 年 Goldstein 首次从小牛胸腺中提纯了具有生物活性的物质, 将其命名为胸腺素 (Thymosin)。随后发现这是一组多肽激素。到目前为止其中了解得比较清楚的是胸腺素  $\alpha$  原 (Prothymosin  $\alpha$ , Pro T $\alpha_1$ )、胸腺素  $\alpha_1$  (T $\alpha_1$ ) 以及胸腺素  $\beta_4$  (T $\beta_4$ )。

Goldstein 最先从胸腺素混合物中分离出胸腺素  $\alpha_1$ , 它是一个二十八肽 (氨基酸序列见图 3), 分子量约 3000 dalton。它可以预防免疫抑制病人感染条件致病菌, 提高机体的细胞免疫能力, 可用于治疗多种疾病如红斑狼疮、乙肝、艾滋病等, 还可作为治疗某些癌症的辅助药物<sup>[33-37]</sup>。

Ac-Ser-Asp-Ala-Ala-Val-Asp-Thr-Ser-Ser-Glu-Ile-Thr-Thr-Lys-  
Asp-Leu-Lys-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn

图 3 胸腺素  $\alpha_1$  氨基酸序列

Fig.3 Amino acid sequences of thymosin  $\alpha_1$

现在胸腺素制剂已广泛应用于临床, 但均是从猪、牛的胸腺中提取的多组分胸腺肽, 提取时易混入猪、牛的某些蛋白, 注射后可能导致人产生过敏反应。采用人胚胎提取的人胸腺素虽疗效不错, 但人胚胎来源困难, 难以形成规模生产。用多肽合成仪可合成胸腺素, 但价格太贵。所以急需另觅新法生产胸腺素, 在此情况下建立生产胸腺素的转基因工程菌成为首选。

T $\alpha_1$  基因的克隆报道不多。王震熙等 (1989) 把 T $\alpha_1$  基因导入 PWR590 菌株, 用 SPA-ELISA 改良法在转化的菌株中检测到 T $\alpha_1$  的表达<sup>[38]</sup>; Wetzel 等 (1980) 根据 Low 和 Goldstein (1979) 确定的氨基酸序列人工合成了 T $\alpha_1$  基因, 与质粒 pBR322 连接后导入 E.coli 中表达, 虽得到与天然 T $\alpha_1$  活性相同的表达产物, 但表达量低<sup>[39]</sup>。

本研究的出现是希望能为解决上述诸问题提供有效的途径。



## 四、泛素与基因工程

在基因工程中进行异源基因表达时常碰到的一个普遍性问题是表达量低。这与许多因素有关，如转录或翻译的低效，宿主对 mRNA 或蛋白质的降解等。虽然人们采取了许多方法来改进，如使用强启动子，有效的转录起始信号和翻译信号等，但表达水平仍不能令人满意。此外有时表达量虽高，但生物活性低，这是由于蛋白质的折叠或翻译后修饰不当所致。

泛素 (Ubiquitin, UB) 是一种含有七十六个氨基酸的多肽，它广泛存在于所有真核生物中，是真核生物所有已知蛋白中最保守的一种。在真核生物中它作为一个自由分子存在，或者以其 C 末端与其他蛋白的 Lys 的  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> 共价相连<sup>[40]</sup>。

已有许多研究工作报告，如果 Ub 的 C 末端与表达量低或表达不稳定的蛋白质的 N 末端融合，可以显著提高目的蛋白表达量及表达稳定性。Butt 等 (1989) 将 Ub 基因分别与酵母金属硫蛋白 (Mt) 或哺乳动物 GTP 结合蛋白的  $\alpha$  亚单位 ( $G_s\alpha$ ) 基因融合，让其在 E.coli 中表达，可以将 Mt 或  $G_s\alpha$  的表达量从微量提高到细胞总蛋白量的 20%。他们认为产量增加是由于提高了目的蛋白的翻译效率及稳定性。融合蛋白中的目的蛋白可用从兔网织红细胞中提取的蛋白水解酶裂解而释放出来<sup>[40]</sup>。Ecker 等 (1989) 将 Ub 基因分别与哺乳动物的  $G_s\alpha$ ，T 细胞受体蛋白 ( $sCD_4$ ) 及人尿激酶的蛋白酶结构域 (UKP) 的基因融合，让其在酵母中表达，发现可以使目的蛋白的表达量提高几百倍，用酵母内源的 UB 特异性蛋白内切酶酶切后可以释放出目的蛋白。并且还证明所获得的  $G_s\alpha$  与非 UB 融合表达的  $G_s\alpha$  具有同样的生物活性<sup>[41]</sup>。

因此，本研究采用了 Ub- $T\alpha_1$  融合表达，可望提高  $T\alpha_1$  产量。

综上所述，本论文利用基因整合平台系统，将人胸腺素  $T\alpha_1$  基因与 Ub 基因融合后定位整合到丝状蓝藻 *Calothrix* 7601 的染色体中，并用红光诱导 *cpc2* 启动子启动其表达。

## 材料与方法

### 一、材料

#### 1. 菌种与质粒

*E. coli* JM101: 本实验室保存。培养基为 LB 液体培养基或含 1.5% 琼脂的固体培养基。

丝状蓝藻 *Calothrix* 7601: 购自中科院水生所。培养基为 BG-11 液体培养基或含 1.5% 琼脂的固体培养基。25 ~ 35 °C 光照培养，光强 3000~4000 Lux。一般在固体培养基上培养 10 天，挑出藻落，转入液体培养基小量培养 (20ml)，每隔 10 天转接一次。正常培养用日光灯照射，诱导培养用红灯照射。

pUC19 质粒: 本实验室保存。

pKYLX71 质粒: 国外友人提供。

pUCUB 质粒: 由大连宝生物工程公司合成 Ub 基因并 将其克隆至 pUC18 质粒的 Sph I / BamH I 位点之间所构建成的质粒。Ub 基因片段经其测序证明无误。

#### 2. 引物

(1) *cpc2* 左侧同源区 (L) 引物: 由上海生物工程研究中心合成

L1 (5' 端): 5' —CGGAATTCTGCTATTAGTCCGC—3'

- L2 (3' 端): 5' —CGGTCGACGCCCTCGGTTAAAGGTGT—3' (22Nts)  
 Sal I
- (2) cpc2 右侧同源区 (R) 引物: 由上海生物工程研究中心合成
- R1 (5' 端): 5' —CGGTCGACTGTAGCTCCTTAATGTC—3' (25Nts)  
 Sal I
- R2 (3' 端): 5' —CCTAAGCTTTCTTGATATTCGGCTG—3' (25Nts)  
 HindIII
- (3) cpcB2A2 之启动区 (P) 引物: 由华美生物工程公司合成
- P1 (5' 端引物): 5' —GCGTCGACGAATTGTAAGAA—3' (20Nts)  
 Sal I
- P2 (3' 端引物): 5' —ATGCATGCTCCAGCATCTCCTA—3' (22Nts)  
 Sph I
- (4) T $\alpha_1$  基因引物: 由上海生物工程研究中心合成
- T1 (5' 端片段): 5' —GGGCATGCAAGGATCCGACGCAGCTGT  
 Sph I Bam HI  
 TGACACCAGCTCCGAAATCACCACCAAAGACTTAAAGG—3' (65Nts)
- T2 (3' 端片段): 5' —GGGTCGACTAGTTTTCTGCTTCT TCAAC  
 Spe I  
 AACTTCTTTTTTTTCCTTTAAGTCTTTGGTGGTGATT—3' (65Nts)
- T2' (3' 端引物): 为 T2 之 5' 端的前 25 个核苷酸。
- (5) Ub 引物: 购自上海生物工程公司
- U1: 通用引物 M13 / pUC Reverse Sequencing Primer(-48);
- U2: 通用引物 M13 / pUC Sequencing Primer(-47)。

### 3. 主要试剂

限制性核酸内切酶 EcoRI、HindIII、SalI、XbaI 为华美公司产品; SphI 和 SpeI 为 Biolab 产品;

T4 DNA 连接酶, Taq DNA 聚合酶,  $\lambda$ -DNA/ EcoRI+HindIII,  $\lambda$ -DNA/ HindIII及  $\lambda$ -DNA/ HaeIII Marker 为华美公司产品;

dNTP, IPTG 及 X-gal 为 Promega 公司产品;

蛋白酶 K 为 Merck 公司产品;

UB, 兔抗 UB 抗体及羊抗兔 IgG-HRP 为 Sigma 公司产品;

DNA 片段快速回收试剂盒为普宁生物技术(厦门)公司产品;

聚偏二氟乙烯(PVDF)膜为 Boehringer Mannheim 公司产品;

其余试剂均为国产分析纯。

### 4. 常用溶液、培养基配制

(1) BG-11 培养基: 参见文献 42。

(2) LB 培养基: NaCl 1%, 酵母膏 0.5%, 蛋白胨 1%, pH7.0。

(3) 50 $\times$ TAE 琼脂糖凝胶电泳缓冲液及溴酚蓝溶液: 参见文献 43。

(4) 碱变性法提取质粒:

- 溶液 I：葡萄糖 50 mmol/L， EDTA 10 mmol/L， Tris-HCl 25 mmol/L， pH8.0， 高压灭菌， 4℃保存；
- 溶液 II：NaOH 0.2 mol/L， SDS 1%， 现配先用；
- 溶液 III：5 mol/L NaAc 60ml， 冰醋酸 11.5 ml， dH<sub>2</sub>O 285 ml。
- (5) 20×SSC 溶液：800 ml 水中溶解 175.3g NaCl 和 88.2g 柠檬酸钠，加数滴 10 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0， 定容至 1L。
- (6) TE 缓冲液：10mmol/L Tris-HCl， 1mmol/L EDTA， pH8.0。
- (7) 蓝藻 *Calothrix* 7601 染色体 DNA 提取缓冲液：
- 缓冲液 A：50 mmol/L Tris-HCl， pH8.5； 50 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA；
- 缓冲液 B：50 mmol/L Tris-HCl， pH8.5； 50 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA；  
1mol/L NaCl；
- 缓冲液 C：10 mmol/L Tris-HCl， pH8.5； 50 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA；
- 缓冲液 D：10 mmol/L Tris-HCl， pH8.5； 1 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA；  
1mol/L NaCl；
- (8) Western 杂交：
- 制样缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl (pH7.8)， 0.1 mmol/L EDTA，  
10 mmol/L 巯基乙醇， 1 mmol/L NaN<sub>3</sub>；
- SDS-PAGE 上样缓冲液：100 mmol/L Tris-HCl (PH6.8)， 4% SDS，  
0.2% 溴酚兰， 20% 甘油， 200 mmol/L DTT；
- SDS-PAGE 电泳缓冲液：25 mmol/L Tris-HCl (PH8.3) ， 0.1% SDS ，  
250 mmol/L Gly；
- 电转缓冲液：39 mmol/L Gly， 48 mmol / L Tris， 0.037 % SDS，  
20% 甲醇；
- TNT 缓冲液：0.1 mmol/L Tris-Cl (PH7.25)， 0.15 mmol/L NaCl，  
0.05% Tween20；
- 封闭液：含 1% BSA 的 TNT 缓冲液；
- 底物：先配 2 mg/ml TMB (用无水乙醇溶解)。临用时再用 PH5.4 的 0.1% 柠檬酸和 0.2 mol/L PBS 配成 0.1 mg/ml，然后每 ml 加入 3.2ul 0.75% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 。

## 5. 主要仪器

TGL-16G 台式高速离心机	上海医用分析仪器厂
TGLL-18G 台式高速冷冻离心机	江苏太仓市医疗器械厂
PCR-90AD 型 DNA 扩增仪	中科院遗传所
MA110 型电子分析天平	上海第二天平仪器厂
BL310 型电子分析天平	德国 Sartorius 公司
NN-K563S 微波炉	日本松下公司
ZF-5 多功能紫外透射仪	上海顾村电光仪器厂
SHZ-22 水浴恒温振荡器	江苏太仓市医疗器械厂
SHZ-82 气浴恒温振荡器	常州国华公司
DYY-III31A 型电泳槽	北京六一仪器厂
PowerPac300 电泳仪	美国 Bio-Rad 公司
Virsonic475 型超声处理仪	美国 VirTis 公司

## 二、实验方法

### 1. *Calothrix* 7601 染色体 DNA 提取方法<sup>[44]</sup>

- (1) *Calothrix* 7601 在 BG-11 液体培养基中培养到  $A_{550}=0.8$  左右时, 离心收集细胞 (12000rpm, 20min)。
- (2) 每克藻糊用 20 ml 缓冲液 B 悬浮细胞, 加入 N-lauroyl sarcosine 至终浓度 0.2%, 4℃ 轻振摇 1hr。
- (3) 离心收集沉淀, 用与第二步等体积的缓冲液 A 洗涤一次, 再离心收集沉淀。
- (4) 沉淀按每克藻糊用 5 ml 缓冲液 A 悬浮, 加入蔗糖至终浓度 25%, 室温 1hr。
- (5) 加入溶菌酶至终浓度 12 mg/ml, 37℃ 15min; 再加入三倍体积的缓冲液 C, 37℃ 1hr。
- (6) 加入 SDS 至终浓度 1%, 蛋白酶 K 至终浓度 100 ug/ml, 4℃ 过夜后, 37℃ 下继续温育 2hr。
- (7) 离心收集沉淀, 每克藻糊用 20ml 缓冲液 D 溶解, 即为 G-DNA 粗溶液。
- (8) G-DNA 粗溶液用酚-氯仿-异戊醇抽提和乙醇沉淀, 干燥后按每克藻糊用 1ml TE 缓冲液溶解。
- (9) 加入 RNase A 至终浓度 10 ug/ml DNA 溶液, 37℃, 30min。

### 2. PCR 扩增

#### 2.1 cpc2 启动区(630bp)

- (1) 在 0.5ml 无菌离心管中依次加入:

ddH <sub>2</sub> O	37ul
10×Taq 酶缓冲液	5ul
4×dNTP (2.5 mmol/L/L)	4ul
P1 引物	1ul
P2 引物	1ul
模板 (蓝藻 G-DNA)	1ul
Taq 酶 (1u/ul)	1ul
<hr/>	
总体积	50ul
另加石蜡油	50ul

- (2) PCR 反应参数:

94℃, 5min;  
94℃, 45S; 50℃, 45S; 72℃, 45S; 30 个循环  
72℃, 5min。

- (3) 反应结束后, 取 5ul 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

#### 2.2 同源片段 L(1.2Kb)

除引物改为 L1, L2, 延伸时间改为 75S 之外, 其余均同 2.1。

#### 2.3 同源片段 R(1.2Kb)

除引物改为 R1, R2 外, 其余均同 2.2。

#### 2.4 胸腺素 T $\alpha_1$ 基因(110bp)

- (1) 取 T1 和 T2 引物各 2ul, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 10ul, 再加石蜡油 30ul;
- (2) 85℃, 5min 后以 1℃/1min 的速度冷却至 25℃;
- (3) 再依次加入:

ddH <sub>2</sub> O	30ul
10×Taq 酶缓冲液	5ul
4×dNTP (2.5mmol/L/L)	4ul
Taq 酶 (1u/ul)	1ul

- (4) PCR 反应参数:

94℃, 5min;  
94℃, 30S; 60℃, 20S; 10 个循环  
60℃, 20S。

- (5) 反应结束后, 取 3ul 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

#### 2.5 Ub 片段 (345bp)

- (1) 除模板改为质粒 pUCUB, 引物改为 U1 和 U2 外, 其余反应组分同 2.1;
- (2) PCR 反应参数:

94℃, 5min;  
94℃, 30S; 50℃, 30S; 72℃, 30S; 30 个循环  
72℃, 3min。

- (3) 反应结束后, 取 5ul 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

#### 2.6 Ub- T $\alpha_1$ 片段 (388bp)

除模板改为 Ub 与 T $\alpha_1$  之连接物, 引物改为 U1 和 T3 外, 其余反应组分及反应参数同 2.5。

#### 2.7 P-Ub-T $\alpha_1$ 片段 (960bp)

除引物改为 P1 和 T2 外, 其余反应组分及反应参数同 2.2。

### 3. PCR 产物的克隆

#### 3.1 从琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段

- (1) PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 在紫外灯下, 切下含有所需 DNA 带的凝胶, 置一管中称重。
- (2) 加入三倍量 (v/w) 的 6 mol/L NaI 溶液, 55℃温浴至胶完全溶解 (约 10min)。
- (3) 加入 20 ul 基因纯试剂, 混匀后室温放置 5min。
- (4) 10000rpm 离心 10S。
- (5) 弃上清液, 加入 500ul 预冷 70% 乙醇, 混匀, 10000rpm 离心 10S。
- (6) 重复步骤 (5) 两次。
- (7) 沉淀干燥后, 加入 20 ul dH<sub>2</sub>O 悬浮, 置 55℃水浴 5min, 15000rpm 离心 3min。
- (8) 取上清-20℃保存备用。

#### 3.2 PCR 产物的连接和转化

- (1) 按照 PCR 片段两端设计的酶切位点, 进行 PCR 片段的双酶切, 与同样双酶切的载体 (如 pUC19 质粒) 混合, 加 T<sub>4</sub> DNA 连接酶 12℃连接过夜。
- (2) 在 200ul 感受态细胞 (采用 CaCl<sub>2</sub> 法制备) 中加入 5ul 连接的 DNA, 混匀, 冰浴 30min。
- (3) 42℃水浴 2min, 再冰浴 2min, 加入 800ul LB 液体培养基, 37℃轻摇 1hr。
- (4) 取 200ul 置于另一管中, 加入 4ul IPTG (200mg/ml) 和 40ul X-gal (20mg/ml), 混匀

- 后涂布 LB 平板（含 Ap 100ug/ml），37℃培养 10hr 左右。
- 3.3 重组子的筛选和鉴定
- (1) 通过蓝白筛选，初步挑出若干白色菌落，接种于 4ml LB(含 Ap 100 ug/ml)液体培养基中，37℃振荡培养过夜。
  - (2) 小量提取质粒<sup>[43]</sup>。
  - (3) 进行 PCR 和酶切鉴定<sup>[43]</sup>。

#### 4. 亚克隆

方法与 PCR 产物的克隆类似

#### 5. 电激转化蓝藻 *Calothrix 7601*<sup>[11]</sup>

- (1) 培养蓝藻至  $A_{550}=0.6$  左右。
- (2) 100 ml 藻液离心浓缩成 3 ml，超声处理 30s（功率 3）。
- (3) 离心收集藻细胞，用预冷的 1.0 mmol/L HEPES（pH7.2）缓冲液离心洗涤两次。
- (4) 将藻细胞悬浮在预冷的 1.0 mmol/L HEPES（pH7.2）缓冲液中。
- (5) 加入 DNA 至终浓度为 10 ug/ml。
- (6) 取 40 ul 含 DNA 的藻细胞悬浮液，加入到预冷的无菌的一次性电激杯（规格 1mm）中。
- (7) 预置电激仪的各参数（参见表 1），装上电激杯，电激。

表 1 电激参数（阳性和阴性对照仅使用 C、H 两种条件）

Tab.1 Parameters of electroporation

样品编号	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
电压 (kv)	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
电阻 (Ω)	100					200				
时间 (ms)	2.5					5.0				
电容 (uF)	25									

#### 6. 蓝藻转化子的筛选

- (1) 将电激处理后的藻细胞悬浮液立即转入 20ml BG-11 液体培养基（含 Km 20 ug/ml）中培养，每天补充 4 ug/ml Km，以补充培养过程中自然分解掉的 Km。经常摇动，培养 10 天。
- (2) 选取生长良好的三瓶藻液，各吸取 100 ul 藻液，涂布在 BG-11 平板上（含 1.5% 琼脂，Km 20 ug/ml），培养 10 天。
- (3) 挑出生长最好的 5 个克隆子，转入 20ml BG-11 液体培养基中（含 Km 20ug/ml），经常摇动，培养 10 天。
- (4) 从克隆藻株培养液中各吸取 1ml 藻液，分别加入到含不同浓度 Km（分别为 5，10，20，30，40，50，60，70，80 ug/ml）的 20ml BG-11 液体培养基中，经常摇动，培养 10 天。
- (5) 根据生长状况，判定各克隆藻株抗 Km 的最高浓度。

(6) 选取抗性最高的克隆子进行较大量的培养 (200ml)。每隔 10 天转接一次保种。

## 7. Western 杂交

### 7.1 *Calothrix* 7601 的诱导

当 *Calothrix* 7601 培养到  $A_{550}=0.8$  左右时, 取 10ml 在红光中处理 30min。

### 7.2 制样:

离心取藻体, 置于一预先称重的管中, 称出藻重, 加入 1 倍量 (V/W) 的制样缓冲液和 1 倍量 (V/W) 的上样缓冲液, 沸水浴 5min, 离心, 取上清液, 置-20℃保存备用。

### 7.3 SDS-PAGE<sup>[43]</sup>

(1) 制胶: 15% 分离胶, 5% 浓缩胶

(2) 点样: 将样品沸水浴 3min 后加至凝胶点样孔中, 先用 50V 电压电泳, 待溴酚兰跑出浓缩胶后, 将电压增至 100V, 当溴酚兰跑至凝胶边缘时停止电泳。

### 7.4 电转移<sup>[45]</sup>

(1) 取出胶, 浸泡于电转缓冲液中。

(2) 剪取与凝胶等大的 PVDF 膜, 先在水甲醇中润湿, 再在电转缓冲液中浸泡; 另剪六张与膜等大的滤纸, 浸于电转缓冲液中; 将电转仪中的海绵也浸于电转缓冲液中。

(3) 将海绵、滤纸 (3 张)、凝胶、膜、滤纸 (3 张)、海绵按顺序放好, 注意避免气泡, 边界对齐, 然后用筛孔板固定, 插入电转移槽中, 凝胶在阴极方向, 膜在阳极方向。加入电转缓冲液, 4℃, 100V, 转移 1hr。

### 7.5 免疫学检测<sup>[46]</sup>

(1) 将膜置于 TNT 缓冲液中洗 3 次, 每次 5min。

(2) 转入封闭液中, 37℃轻摇 30min。

(3) 置 TNT 缓冲液中漂洗 3 次, 每次 5min。

(4) 加入用 TNT 缓冲液稀释的兔抗 UB 抗体, 37℃轻摇 1hr。

(5) 置 TNT 缓冲液中漂洗 3 次, 每次 5min。

(6) 加入用 TNT 缓冲液稀释的羊抗兔 IgG-HRP, 37℃轻摇 1hr。

(7) 置 TNT 缓冲液中漂洗 4 次, 每次 5min。

(8) 加入 TMB 底物液, 显色 15min, 出现蓝色条带者为阳性, 用水冲洗以终止反应, 取出晾干。

(9) 拍照。

## 结果与分析

供体质粒是基因整合平台系统的主要部分, 包括整合靶位同源 DNA 片段和外源供体 DNA 片段, 通过供体质粒把外源基因组入受体细胞染色体。

### 一、cpc2 启动区 (P) 和同源 DNA 片段 (L 和 R) 的克隆

丝状蓝藻 *Calothrix* 7601 的 cpc2 操纵子的启动区 P 以及同源片段 L 和 R 皆已定序<sup>[26,48]</sup>。根据这三个片段两端的核苷酸序列分别设计三对 PCR 引物 P1 和 P2, L1 和 L2, R1 和 R2(序列见本论文材料部分), 其中启动区左端引物 P1 设计了一个 SphI 酶切位点, 其序列为 GCATG ↓ C, 可以保证不破坏 ATG 起始的阅读框以及 ATG 上游几个碱基序列。

#### 1. 片段 P(0.6Kb), L(1.2Kb)和 R(1.2Kb)的 PCR 扩增

以 *Calothrix* 7601 的染色体 DNA 为模板，按常规的 PCR 技术进行扩增，产物用琼脂糖凝胶电泳检测，在电泳图谱上分别出现唯一的 0.6Kb，1.2Kb 和 1.2Kb 片段（见图 1），表明这三个片段是预期的扩增片段。

M 1 2 3 4 5 6 M

图 1 片段 P、L 和 R 的 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.1 Agarose gel electrophoresis analysis of the PCR product of fragment P, L and R

M.  $\lambda$ -DNA / EcoR I+HindIII Marker

1.3. 5 分别为片段 P、L 和 R 之阴性对照

2.4.6. 分别为 P、L、R 之 PCR 产物



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库